

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 7/04, 15/88, A61K 48/00, 39/12, G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/15630 (43) Date de publication internationale: 1er avril 1999 (01.04.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02029 (22) Date de dépôt international: 22 septembre 1998 (22.09.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/11772 22 septembre 1997 (22.09.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE [FR/FR]; LA RECHERCHE MÉDICALE), 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TOUZE, Antoine [FR/FR]; 1, allée Pinaigrier, Résidence Gallardon, F-37170 Chambray les Tours (FR). COURSAGET, Pierre [FR/FR]; 6, place de Richemont, F-37550 Saint-Avertin (FR). (74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).</p>		<p>(81) États désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: ARTIFICIAL VIRUSES DERIVED FROM PAPILLOMAVIRUS, AND THEIR USES, IN PARTICULAR GENE THERAPY (54) Titre: VIRUS ARTIFICIELS DERIVES DE PAPILLOMAVIRUS, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THÉRAPIE GÉNÉTIQUE (57) Abstract The invention concerns the use of virus -like particles (VLP's) of papillomavirus for preparing vector pseudoviruses useful for transferring genetic material into target cells of the organism. (57) Abrégé La présente invention a pour objet l'utilisation de pseudo-particules virales (VLPs) de papillomavirus pour la préparation de pseudovirus vecteurs utilisables pour le transfert de matériel génétique dans des cellules cibles de l'organisme.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

VIRUS ARTIFICIELS DÉRIVÉS DE PAPILLOMAVIRUS, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THÉRAPIE GÉNIQUE.

5

La présente invention a pour objet des virus artificiels (ou pseudovirus) dérivés de papillomavirus humains ou animaux, ainsi que leurs procédés d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques dans le cadre de thérapies géniques, ou pour la détection d'anticorps neutralisant les papillomavirus.

10

L'efficacité, la spécificité et l'innocuité des systèmes de vecteurs utilisés pour le transfert de gènes, sont des facteurs importants en vue de leurs applications chez l'homme, notamment dans le cadre de la thérapie génique ou de l'immunisation par l'ADN.

15

Les techniques classiques pour le transfert de plasmides à l'intérieur des cellules eucaryotes, sont essentiellement celles utilisant les liposomes (Felgner et al., 1987 ; Felgner and Ringold, 1989) susceptibles de contenir des peptides de fusion d'origine virale, ou utilisant des virus entiers afin de faciliter le relargage de l'ADN dans le cytoplasme (Kamata et al. 1994 ; Wagner et al., 1994).

20

Les virus représentent actuellement le plus efficace système naturel de transfert de gènes (II).

25

Les adénovirus (Berkner, 1992 ; Kozarsky and Wilson, 1993 ; Kremer and Perricaudet, 1995), les virus associés aux adénovirus (Kremer and Perricaudet, 1995 ; Kotin, 1994 ; Fisher et al., 1997), le virus Epstein-Barr (Banerjee et al., 1995) et les rétrovirus (Miller, 1992 ; Danos and Mulligan, 1988 ; Naldini et al., 1996), ont été modifiés pour transporter des gènes d'intérêt thérapeutique et pour intégrer leur propre génome à l'intérieur de cellules cibles.

30

L'utilisation de vecteurs viraux pose cependant des problèmes, notamment la production possible de virus capables de se répliquer dans le cas où se produit une recombinaison avec des virus sauvages présents dans les cellules cibles, l'inactivation des vecteurs par des anticorps neutralisant préexistants dirigés contre ces virus dans l'organisme hôte, et la réponse immunologique induite par le virus (Gahéry-Ségard et al., 1997 ; Juillard et al., 1995).

35

Durant les dix dernières années, il a été montré que les protéines de structure de nombreux virus sont capables de s'auto-assembler en pseudo-particules virales (encore désignées ci-après par l'expression VLPs) lorsqu'elles sont exprimées dans des systèmes d'expression eucaryotes ou procaryotes.

Les papillomavirus sont des membres de la famille des *papovaviridae*. Ce sont des virus à ADN non enveloppés, qui infectent les humains ainsi que certains animaux. La capsid du papillomavirus est constituée de deux protéines, L1 et L2. L1 est la protéine majeure de capsid, et a déjà été décrite comme étant capable de s'auto-assembler en VLPs.

Des VLPs ont été obtenues par transformation de cellules de hamster, porteuses de génomes de papillomavirus bovin de type I (BPVI) capables de se répliquer de façon autonome, avec des virus de la forêt de Semliki (SVF) recombinants exprimant les protéines de structure de BPVI (Roden et al., 1996). Selon les auteurs de cet article, la protéine L1 exprimée par les SVF recombinants, est capable de s'auto-assembler en VLPs. Toutefois, de l'ADN viral n'a pu être détecté que dans les VLPs résultant de la co-expression de L1 et L2, ce qui, toujours selon ces mêmes auteurs, indique que l'encapsidation d'ADN à l'intérieur des VLPs, ne peut avoir lieu que si ces VLPs sont constituées à la fois de L1 et L2.

Le but du travail décrit dans cet article de Roden et al., est celui de l'obtention de particules infectieuses de papillomavirus humain (HPV) capables d'infecter des cellules de souris, et d'étudier la possibilité de neutraliser cette infection par des anticorps. Ainsi, les auteurs de cet article ont préparé des VLPs d'HPV type 16 ayant encapsidé le génome du BPV selon un procédé qui a la caractéristique d'être intracellulaire, puisque ce procédé, décrit ci-dessus, est effectué dans des cellules de hamster contenant le génome de BPV et transformées par des SVF exprimant les protéines L1 et L2 d'HPV-16.

Des VLPs constituées de la protéine L1 de papillomavirus humain de type 11 (HPV-11), ont été obtenues par transformation de bactéries *E.coli* avec des plasmides contenant la séquence codant la protéine L1 (Li et al., 1997). Les auteurs de cet article, ont constaté que ces VLPs obtenues par transformation d'*E.coli* sont très difficiles à désassembler.

Des VLPs constituées de la protéine L1, et des VLPs constituées des protéines L1 et L2, des papillomavirus humains de type 33 (HPV-33), ont été obtenues par un procédé intracellulaire comprenant la cotransformation de cellules Cos-7 d'une part avec un plasmide marqueur codant pour la β -galactosidase et, d'autre part, avec le virus de la vaccine en tant que vecteur contenant la séquence codant pour L1, ou celles codant pour L1 et L2 (Unckell et al., 1997).

Le taux de l'encapsidation par la méthode intracellulaire susmentionnée, du plasmide contenant la séquence codant pour la β -galactosidase, est très faible, puisque seulement 1 VLP sur 25.000 porte ce plasmide.

Par ailleurs, le taux d'infection des cellules Cos-7 par les VLPs porteurs dudit plasmide est également très faible, puisque seulement 1 sur 2.000 VLPs porteuses du plasmide est capable d'infecter une cellule Cos-7.

Enfin, les auteurs de cet article insistent sur le caractère essentiel de la protéine L2 dans le cadre de l'infection des cellules par les VLPs.

Compte tenu des faibles taux d'intégration d'ADN plasmidique dans les VLPs, et d'infection de cellules par ces VLPs, les auteurs de cet article n'ont en aucun cas fait part de la possibilité d'utiliser de telles VLPs en tant que vecteurs de transfert de gènes, et se sont focalisés sur leur utilisation possible dans le cadre de la détection d'anticorps neutralisant contre les infections des papillomavirus.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que les VLPs de papillomavirus sont capables d'intégrer de l'ADN plasmidique avec un taux d'encapsulation bien supérieur à ceux décrits ci-dessus, dans la mesure où cette encapsulation est effectuée par un procédé extracellulaire (c'est-à-dire qui n'est pas effectué à l'intérieur de cellules hôtes), notamment par désassemblage-réassemblage *in vitro* de ces VLPs en présence de plasmide.

De plus, les Inventeurs ont également mis en évidence que les taux d'infection de cellules par des VLPs porteurs d'ADN plasmidique obtenus selon le procédé extracellulaire d'encapsulation indiqué ci-dessus, sont bien supérieurs à ceux décrits dans l'art antérieur susmentionné, et ce même lorsque lesdites VLPs sont constituées de la seule protéine L1.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouveaux vecteurs de transfert de matériel génétique dans des cellules cibles, notamment dans le cadre de la thérapie génique, ou de l'immunisation génique, ces vecteurs étant plus simples à préparer, et plus sûrs à utiliser que les virus vecteurs décrits jusqu'à présent.

Un autre but de la présente invention est celui de fournir un procédé simple de préparation de ces vecteurs de transfert.

Un autre but de la présente invention est celui de fournir de nouvelles compositions pharmaceutiques contenant lesdits vecteurs de transfert, et utilisables en thérapie génique, ou immunisation génique.

Un autre but de la présente invention est celui de fournir de nouveaux réactifs pour la détection d'anticorps neutralisant les papillomavirus, ainsi que de nouveaux kits pour la mise en oeuvre d'une telle méthode de détection.

La présente invention a pour objet l'utilisation de pseudo-particules virales (VLPs) de papillomavirus humains ou animaux, pour la préparation de pseudovirus vecteurs utilisables pour le transfert de matériel génétique d'intérêt thérapeutique, dans des cellules cibles de l'organisme, notamment dans le cadre de thérapie génique ou d'immunisation génique.

Avantageusement, les VLPs utilisées dans le cadre de la présente invention, contiennent la protéine L1, et le cas échéant la protéine L2, des papillomavirus.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les VLPs susmentionnées contiennent uniquement la protéine L1 (à savoir que lesdites VLPs sont formées de capsomères uniquement constitués de protéines L1).

Par matériel génétique d'intérêt thérapeutique transféré par les pseudovirus vecteurs dans des cellules cibles dans le cadre de la présente invention, on entend toute séquence nucléotidique (ADN ou ARN) hétérologue d'intérêt thérapeutique, à savoir toute séquence susceptible de coder pour une protéine capable de traiter une pathologie déterminée, ou d'immuniser un individu contre une pathologie déterminée, ladite séquence n'étant pas comprise dans le génome naturel des papillomavirus.

Dans le cas particulier du traitement des pathologies dues aux infections par des papillomavirus, notamment des tumeurs associées à ces infections, ou de l'immunisation contre ces infections (et donc de la prévention de ces pathologies), ladite séquence hétérologue peut consister en un fragment du génome des papillomavirus, ou en une séquence nucléotidique dérivée de ce fragment.

Par séquence d'ADN hétérologue d'intérêt thérapeutique, on entend notamment :

- toute séquence d'ADN susceptible de coder pour une protéine dans le cadre de pathologies dans lesquelles ladite protéine est déficiente,
- toute séquence d'ADN codant pour une protéine agissant en tant que vaccin,
- toute séquence d'ADN codant pour une protéine agissant en tant qu'anticorps neutralisant des pathogènes,
- toute séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible d'interagir directement ou indirectement avec des protéines impliquées dans le développement de certaines pathologies,
- toute séquence d'ADN codant pour un ARN antisens susceptible d'inhiber la production d'une protéine impliquée dans le cadre du développement d'une pathologie.

Les cellules cibles dans lesquelles le matériel génétique est transféré dans le cadre de la présente invention, sont toutes cellules susceptibles d'être infectées par des papillomavirus ou des VLPs de ces papillomavirus.

Les pseudovirus vecteurs de l'invention sont soit administrés sous forme de compositions pharmaceutiques, notamment dans les conditions définies ci-

après, soit utilisés pour la mise en oeuvre d'un procédé de transformation *in vitro* de cellules, notamment des cellules d'un patient, les cellules ainsi transformées par les pseudovirus étant ensuite réadministrées au patient.

Avantageusement, les VLPs utilisées dans le cadre de la présente invention, sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes avec des vecteurs contenant une séquence d'ADN codant pour la protéine L1 des papillomavirus et, le cas échéant, une séquence d'ADN codant pour la protéine L2 des papillomavirus, lesdites séquences étant placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription, et récupération des VLPs produites dans lesdites cellules hôtes par assemblage des capsomères de protéines L1 et, le cas échéant de protéines L2. Les capsomères susmentionnés résultent eux-mêmes de l'assemblage des protéines L1, à raison d'environ 5 protéines L1 par capsomère, une VLP étant constituée de 7 capsomères. Dans le cas où les VLPs contiennent à la fois la protéine L1 et la protéine L2, il y a environ 30 protéines L2 par VLP.

Avantageusement encore, les VLPs utilisées dans le cadre de la présente invention, sont telles qu'obtenues par transformation de cellules d'insectes, à titre de cellules hôtes, avec des baculovirus utilisés en tant que vecteurs contenant les séquences d'ADN codant pour la protéine L1 et, le cas échéant la protéine L2, lesdits baculovirus vecteurs étant eux-mêmes obtenus par transformation de ces derniers avec des plasmides contenant lesdites séquences d'ADN codant pour la protéine L1 et, le cas échéant L2, sous le contrôle d'éléments de régulation de leur expression.

Selon un autre mode avantageux de réalisation de l'invention, les VLPs utilisées dans le cadre de la présente invention, sont telles qu'obtenues par transformation de levures ou de cellules de mammifères (telles que les cellules CHO), à titre de cellules hôtes, avec des plasmides utilisés en tant que vecteurs, contenant les séquences d'ADN codant pour la protéine L1, et le cas échéant la protéine L2, lesdites séquences d'ADN étant placées sous le contrôle d'éléments de régulation de leur expression.

Avantageusement, les VLPs produites dans les cellules hôtes dans le cadre des procédés susmentionnés, sont purifiées à partir des milieux de culture desdites cellules hôtes, généralement après lyse de ces dernières ; parmi les techniques utilisables pour purifier lesdites VLPs à partir de ces surnageants de culture, on peut citer :

- l'ultracentrifugation en sucrose, isopycnique, ou en gradient de densité (ex CsCl),

la précipitation par relargage au polyéthylène glycol (PEG), ou au sulfate d'ammonium,

- la chromatographie d'exclusion, ou d'échange d'ions,
- l'utilisation d'immunoabsorbants,
- l'isoélectrofocalisation.

L'invention a également pour objet l'utilisation de VLPs de papillomavirus définies ci-dessus, pour la préparation d'un médicament comprenant des pseudovirus vecteurs tels que définis ci-dessus, ces derniers correspondant auxdites VLPs dans lesquelles une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont encapsidées, lesdits pseudovirus étant en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, ledit médicament étant destiné au traitement ou à la prévention de pathologies, telles que décrites ci-dessus, susceptibles d'être traitées par thérapie génique ou prévenues par immunisation génique.

L'invention concerne également tout pseudovirus vecteur de transfert de matériel génétique dans des cellules cibles de l'organisme dans le cadre de la thérapie génique, ou de l'immunisation génique, caractérisé en ce qu'il correspond à une VLP de papillomavirus humains ou animaux, dans laquelle une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont encapsidées.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout pseudovirus vecteur de transfert tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est formé d'une VLP en association avec une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues encapsidées à l'intérieur de cette VLP, ladite VLP comprenant un assemblage de capsomères de protéine L1, et le cas échéant de protéine L2, de papillomavirus (notamment dans les proportions indiquées ci-dessus).

Avantageusement, les VLPs formant les pseudovirus susmentionnés, comprennent uniquement la protéine L1 de papillomavirus.

Les pseudovirus vecteurs selon l'invention sont davantage caractérisés en ce que la ou les séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont insérées dans un plasmide contenant les éléments nécessaires à la régulation de l'expression de ces séquences d'ADN, la taille maximale dudit plasmide étant d'environ 8 à environ 8,5 kb.

Avantageusement, les pseudovirus vecteurs selon l'invention, sont tels qu'obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsulation d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique, à l'intérieur desdites VLPs.

De préférence, ce procédé extracellulaire d'encapsidation est effectué par désassemblage-réassemblage des VLPs définies ci-dessus, en présence d'un vecteur, notamment d'un plasmide, contenant la (ou les) séquence(s) nucléotidique(s) hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique.

A ce titre, l'invention vise plus particulièrement tout pseudovirus vecteur tel qu'obtenu par un procédé *in vitro* de désassemblage-réassemblage des VLPs susmentionnées, ce procédé comprenant les étapes suivantes :

- désassemblage des VLPs en capsomères, notamment par incubation de ces dernières avec un agent chélateur tel que l'éthylène glycol tétracétate (EGTA), ou l'éthylène diamine tétracétate (EDTA), et d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT), ou le β -mercaptoéthanol,

- mise en mélange du plasmide contenant la (ou les) séquence(s) d'ADN hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique, avantageusement dans un rapport d'une molécule de plasmide pour une molécule de VLP (soit environ $1\mu\text{g}$ de plasmide, pour environ $5\mu\text{g}$ de VLP),

- réassemblage des capsomères en VLPs contenant le plasmide susmentionné, notamment par augmentation de la concentration en ions Ca^{++} , et addition d'un agent oxydant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par toute autre méthode neutralisant l'action de l'agent réducteur susmentionné, notamment par dialyse.

Le cas échéant, le procédé susmentionné comprend une étape de séparation, notamment par des techniques chromatographiques, d'une part des VLPs dans lesquelles lesdites séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont encapsidées et, d'autre part, des VLPs demeurées vides (ne contenant pas lesdites séquences nucléotidiques) après la mise en oeuvre dudit procédé.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique (notamment vaccin), caractérisée en ce qu'elle comprend un pseudovirus vecteur de transfert contenant au moins une séquence d'ADN d'intérêt thérapeutique, et tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De préférence, les VLPs formant les pseudovirus dans les compositions pharmaceutiques susmentionnées, comprennent uniquement la protéine L1 de papillomavirus.

Avantageusement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont davantage caractérisées en ce qu'elles sont administrables par voie orale, intramusculaire, intraveineuse, intradermique, sous-cutanée, nasale, vaginale,

dermique, notamment à raison d'environ 10 ng à environ 10 µg de pseudovirus vecteurs par individu et par prise.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de pseudovirus vecteurs correspondant aux VLPs telles que définies ci-dessus, dans lesquelles une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues (notamment des séquences nucléotidiques codant pour des gènes rapporteurs) sont encapsidées, lesdits pseudovirus vecteurs étant obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsidation, tel que décrit ci-dessus, desdites séquences nucléotidiques hétérologues dans lesdites VLPs, pour la mise en oeuvre d'un procédé de transfert *in vitro* desdites séquences nucléotidiques hétérologues dans des cellules susceptibles d'être infectées par lesdits pseudovirus vecteurs.

Avantageusement, les VLPs formant les pseudovirus susmentionnés, comprennent uniquement la protéine L1 de papillomavirus.

A ce titre, la présente invention a pour objet tout procédé de transfert *in vitro* de séquences nucléotidiques hétérologues dans des cellules susceptibles d'être infectées par des pseudovirus vecteurs définis ci-dessus, lesdits pseudovirus étant obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsidation desdites séquences nucléotidiques hétérologues dans des VLPs de papillomavirus, ce procédé extracellulaire d'encapsidation étant tel que décrit ci-dessus (dans lequel le plasmide contenant la (ou les) séquence(s) nucléotidique(s) hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique est remplacé par un plasmide contenant la (ou les) séquence(s) nucléotidique(s) hétérologue(s)), ledit procédé de transfert comprenant une étape d'incubation desdites cellules en présence des pseudovirus vecteurs définis ci-dessus.

L'invention concerne également l'utilisation de pseudovirus vecteurs correspondant aux VLPs telles que définies ci-dessus, dans lesquelles au moins un gène rapporteur est encapsidé, lesdits pseudovirus étant tels qu'obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsidation, tel que décrit ci-dessus, du ou des gène(s) rapporteurs dans lesdites VLPs, pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection d'anticorps neutralisant l'infection des papillomavirus humains ou animaux.

Avantageusement, les VLPs formant les pseudovirus susmentionnés, comprennent uniquement la protéine L1 de papillomavirus.

L'invention a également pour objet un procédé de détection *in vitro* d'anticorps neutralisant les papillomavirus humains ou animaux comprenant les étapes suivantes :

- incubation *in vitro* de pseudovirus vecteurs définis ci-dessus contenant un gène rapporteur, avec des cellules susceptibles d'être infectées par

des pseudovirus vecteurs (telles que les cellules HeLa ou Cos-7), en présence d'anticorps dont le pouvoir neutralisant est testé, lesdits pseudovirus vecteurs étant obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsulation du (ou des) gène(s) rapporteur(s) dans des VLPs de papillomavirus, ce procédé extracellulaire d'encapsulation étant tel que décrit ci-dessus (dans lequel le plasmide contenant la (ou les) séquence(s) nucléotidique(s) hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique, est remplacé par un plasmide contenant le (ou les) gène(s) rapporteur(s)),

analyse de l'expression ou non du gène rapporteur à l'intérieur de ces cellules, l'absence d'expression du gène rapporteur dans lesdites cellules étant corrélable au fait que les anticorps testés ont neutralisé l'infection des cellules par lesdits pseudovirus, et donc que ces anticorps représentent des anticorps neutralisant susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement des pathologies dues à l'infection par des papillomavirus.

Parmi les gènes rapporteurs susceptibles d'être utilisés, on peut citer ceux de la β -galactosidase, l'aéuorine (GFP), la luciférase, etc...

L'invention concerne également un kit (ou trousse) pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection tel que décrit ci-dessus, ce kit comprenant :

- des pseudovirus vecteurs contenant au moins un gène rapporteur, tels qu'obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsulation, tel que décrit ci-dessus, du ou des gènes rapporteurs dans lesdites VLPs,
- des cellules susceptibles d'être infectées par lesdits pseudovirus vecteurs,
- des réactifs nécessaires à la révélation de l'activité codée par le gène rapporteur.

L'invention concerne également le procédé décrit ci-dessus de préparation de pseudovirus tels que définis ci-dessus de papillomavirus humains ou animaux susceptibles d'être utilisés en tant que vecteur de transfert de matériel génétique (à savoir de séquences nucléotidiques hétérologues, le cas échéant d'intérêt thérapeutique, telles que définies ci-dessus) dans des cellules cibles, ledit procédé étant effectué par désassemblage-réassemblage *in vitro* des VLPs susmentionnées et comprend les étapes suivantes :

- désassemblage des VLPs en capsomères, notamment par incubation de ces dernières avec un agent chélateur tel que l'éthylène glycol tétracétate (EGTA), ou l'éthylène diamine tétracétate (EDTA), et d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT), ou le β -mercaptoéthanol,
- mise en mélange du plasmide contenant la (ou les) séquence(s) d'ADN hétérologue(s), le cas échéant d'intérêt thérapeutique, avantageusement

dans un rapport d'une molécule de plasmide pour une molécule de VLP (soit environ 1 μ g de plasmide, pour environ 5 μ g de VLP),

réassemblage des capsomères en VLPs contenant le plasmide susmentionné, notamment par augmentation de la concentration en ions Ca^{++} , et addition d'un agent oxydant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par toute autre méthode neutralisant l'action de l'agent réducteur susmentionné, notamment par dialyse,

le cas échéant, séparation, notamment par des techniques chromatographiques, d'une part des VLPs dans lesquelles lesdites séquences nucléotidiques hétérologues sont encapsidées et, d'autre part, des VLPs demeurées vides (ne contenant pas lesdites séquences nucléotidiques) après le réassemblage des capsomères en VLPs.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du procédé de préparation de VLPs telles que définies ci-dessus, contenant une séquence d'ADN hétérologue contenant le gène de la β -galactosidase, ou celui de la protéine fluorescente (GFP), à titre de gènes rapporteurs.

I - Matériels et Méthodes

a) Expression *in vitro* des VLPs de papillomavirus

Les VLPs du papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) sont obtenues par expression du gène L1 de HPV-16 dans le système d'expression du baculovirus selon la méthode décrite dans l'article de Le Cann et al., 1994, et résumée ci-après :

Le gène L1 d'HPV-16 a été amplifié à partir d'un produit pathologique, puis cloné dans le vecteur pTAG.

Le gène est ensuite sous-cloné dans le vecteur pBlue Bac III (Invitrogen) dérivé d'un baculovirus spécifique de l'insecte *Autographa californica*.

Les plasmides sont cotransfectés avec l'ADN du virus sauvage dans des cellules d'insectes, Sf9, Sf21, ou "high-five".

Les virus recombinants sont ensuite sélectionnés par dilution limite.

Les cellules de *Spodoptera Frugiperda* (Sf21) infectées avec le baculovirus recombinant, sont récoltées 4 jours après l'infection et lysées par une solution de Nonidet® P40 dans du PBS pendant 15 mn à température ambiante.

La fraction nucléaire est récupérée par centrifugation (10,000 xg, 15 mn, 4°C) et soumise à 3 x 15s aux ultrasons à la puissance maximale (Vibra-cell®, Bioblock Scientific, Strasbourg, France).

Le lysat nucléaire est déposé sur un gradient de CsCl, centrifugé à l'équilibre dans un rotor Beckman® SW 28 (20 h, 27,000 rpm, 4°C) et récolté en fractions de 1,5 ml.

La densité et la réactivité des HPV en ELISA ont été vérifiées selon la méthode décrite dans l'article de Touzé et al., 1996.

Les fractions positives en ELISA qui ont une densité se situant entre 1,27-1,30; ont été réunies, diluées dans du PBS et soumises à une ultracentrifugation dans un rotor SW 28 (3 h, 28,000 rpm, 4°C).

Le culot est resuspendu dans du NaCl 0,15M.

Le contenu en protéines a été déterminé en utilisant le test MicroBCA Pierce®.

b) Plasmides

Deux plasmides portant différents gènes rapporteurs ont été utilisés. pGreenLantern (Life Technologies, Eragny, France) contenant le gène codant pour la protéine fluorescente (GFP) de *Aequoria victoria* sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus. pCMV-βgal contenant le gène codant pour la β-galactosidase d'*E.coli*. Le plasmide pCMV-HBc a été utilisé pour les études d'immunisation. Ce plasmide contient le gène tronqué à l'extrémité 3' de l'antigène du noyau de l'hépatite B sous le contrôle de promoteur CMV.

c) Désassemblage et réassemblage des VLPs d'HPV-16

Le désassemblage et le réassemblage des VLPs recombinantes d'HPV-16 ont été réalisés selon une méthode adaptée de celle décrite dans l'article de Colomar et al., 1993, dans le cadre des virions SV40.

En résumé, les VLPs d'HPV-16 purifiées à une concentration de 500 µg/ml, sont incubées dans un tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7,5) contenant NaCl 150 mM, EGTA 1mM, et DTT 20mM dans un volume final de 50 µl à température ambiante pendant 30 mn.

A cette étape, 1 µg de plasmide contenant le gène rapporteur (GFP ou β-gal) dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) et NaCl 150 mM est ajouté aux VLPs désassemblées.

Pour encapsider l'ADN dans les particules virales, la concentration en CaCl₂ est ensuite augmentée graduellement jusqu'à 5mM et du DMSO est ajouté (1 % final) (volume final 100 µl). Cette solution est incubée 1 h à 20°C.

Les VLPs reconstituées sont traitées avec 10 U de Benzonase® (Merck, Darmstadt, Allemagne) pendant 1 h à 20°C pour vérifier que l'ADN plasmidique est intégré dans les VLPs, et non pas absorbé à leur surface.

d) Expériences de transfection / infection

Les cellules cultivées en monocouche dans du milieu DMEM/Glutamax® (Life Technologies) complété avec du sérum de veau foetal (FCS), 10%, de la pénicilline 100 IU/ml et de la streptomycine 100 µg/ml, ont été ensemencées sur des plaques à 6 puits (Nunc, Life Technologies) et cultivées jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules ont été lavées deux fois avec du DMEM/Glutamax.

Les pseudo-particules virales pCMV-βgal-VLPs ou pGreenLantern-VLPs dans 1 ml de milieu de culture ont été additionnées aux puits et incubées pendant 4 h à 37°C.

A cette étape, les VLPs ont été retirées, et 3 ml de DMEM/Glutamax complété avec du FCS 10 % ont été additionnés.

A titre de témoin positif, des cellules ont été transfectées en utilisant la même quantité d'ADN (1 µg) avec 10 µl d'un liposome, la lipofectamine® (Life Technologies) selon les instructions du fabricant.

Après 4 h d'incubation à 37°C, 2 ml de milieu de culture contenant du sérum foetal de boeuf ont été additionnés. Puis les cellules ont été incubées pendant 48 h à 37°C.

A ce stade, les activités GFP ou β-galactosidase des cellules ont été analysées.

Pour les expériences de neutralisation, des virus artificiels ont été préincubés pendant 30 min à 37°C avec du PBS contenant un antisérum de souris anti-HPV16-VLPs dilué au 1/100. Cet antisérum a été obtenu par immunisation sous-cutanée de souris avec 5 µg de VLPs d'HPV-16 absorbés sur AlOH₃ en tant qu'adjuvant.

e) Lignées cellulaires

Huit lignées cellulaires ont été utilisées pour ces expériences.

Trois lignées cellulaires humaines comprenant MRC5 (poumon), HeLa (col de l'utérus) et CaCo2 (colon).

Les cellules embryonnaires NIH 3T3 provenant de souris et 4 autres lignées cellulaires animales comprenant les cellules Vero et Cos-7 (singe, rein), MDCK (chien, rein) et CHO (hamster, ovaire), ont été utilisées.

f) Détection de l'activité du gène rapporteur

Pour la détermination de l'activité β-galactosidase *in situ*, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées pendant 10 min à température ambiante avec une solution de formaline 2 % -glutaraldéhyde 0,2 % dans du PBS pour la détection de la β-galactosidase.

Après trois lavages avec du PBS, les cellules ont été exposées à 1 ml d'une solution de PBS contenant $K_3Fe(CN)_6$ 4mM, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 4 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Tris 100 mM (pH 7,4) et 1 mg/ml de X-gal à 37°C, pour l'expression de la β -galactosidase.

Après le développement de la coloration (2-4 h), les cellules ont été lavées avec du PBS et observées.

La détermination quantitative de la β -galactosidase produite dans les lignées cellulaires transfectées a été testée par une méthode ELISA- β -gal (Boehringer, Mannheim, Dassel, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

En résumé, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, 48 h après la transfection. Les cellules ont été lysées et, après centrifugation, le contenu en protéines total des surnageants a été déterminé en utilisant la méthode Bradford et ajusté à une concentration de 500 μ g/ml avant de tester la présence de β -galactosidase.

Des échantillons du surnageant ont ensuite été additionnés aux puits d'une microplaque de 96 puits préenduite avec un anticorps anti- β -galactosidase.

Après une heure d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés et une immunoglobuline anti- β -galactosidase d'*E.coli* conjuguée à la digoxigénine a été additionnée.

Après une deuxième incubation d'une heure à 37°C et trois lavages, les anticorps spécifiquement liés ont été détectés par incubation d'une heure à 37°C avec une immunoglobuline anti-digoxigénine conjuguée à la peroxydase du raifort.

Après trois lavages, une solution d'ABTS a été additionnée et les densités optiques ont été lues à 405 nm après une incubation de 20 mn à température ambiante. La concentration de β -galactosidase (pg/ml) a été déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage.

Pour la détermination de l'activité GFP, le nombre de cellules fluorescentes et non fluorescentes a été déterminé en utilisant la cytométrie en flux FAC Scan pour mesurer l'expression de la protéine GFP.

A cet effet, les cellules ont été traitées par la trypsine, centrifugées et resuspendues dans 1 ml de milieu de culture. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre en flux FAC Sort (Becton-Dickinson, Mountain View, CA. USA). Par ailleurs, les cellules ont été directement observées à l'aide d'un microscope à fluorescence et photographiées directement.

g) Etude d'immunisation

Des souris femelles BALB/c (H-2^d), âgées de 12 à 16 semaines, ont été gardées dans des conditions exemptes de pathogènes durant le protocole d'immunisation.

Les souris BALB/c ont reçu deux injections de 5 μ g de VLPs d'HPV-16 reconstituées contenant le plasmide pCMV-HBc dans le muscle *Tibialis anterior* à deux semaines d'intervalle.

Deux groupes de souris de contrôle ont reçu 100 μ g du plasmide pCMV-HBc au même endroit, avec ou sans cardiotoxine, 5 jours avant l'injection vaccinale, et un groupe de souris de contrôle a reçu 5 μ g de HBcAg recombinant purifié.

L'injection intramusculaire de 100 μ l de cardiotoxine 10 mM a été réalisée de façon à augmenter la capture de l'ADN plasmidique par les cellules musculaires.

Des échantillons de sang ont été recueillis à chaque injection vaccinale et 15 jours après la seconde.

L'HBcAg recombinant assemblé au VLPs a été purifié à partir des cellules d'insectes infectées avec un baculovirus recombinant codant le gène HBc.

h) Détection des anticorps anti-HBc et anti-HPV16

Les anticorps dirigés contre les VLPs d'HBcAg et d'HPV-16, ont été étudiés suivant les techniques ELISA.

Les VLPs d'HPV-16 ou d'HBcAg (100 mg/puits) dans du PBS (pH 7,4) ont été incubées une nuit à 4°C.

Après 4 lavages avec du PBS-Tween 20 0,1 %, les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués par incubation pendant 30 mn à 37°C avec du PBS-NBS 1 % (sérum de nouveau-né bovin).

La solution bloquante a été remplacée par 100 μ l de sérum de souris dilué deux fois dans 5xPBS contenant du NBS 10 % et du Tween 20 2 %.

Après incubation à 45°C pendant 90 mn, et 4 lavages, les anticorps liés ont été détectés avec une immunoglobuline anti-souris liée de façon covalente à la peroxydase de raifort (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

Après incubation à 45°C pendant 90 mn, et 4 lavages, la solution de substrat contenant de l'o-phénylène diamine et H₂O₂ a été additionnée.

La réaction est arrêtée après 30 mn par addition d'H₂SO₄ 4N et les densités optiques (492 nm) ont été lues avec un lecteur automatique (Microplate reader EL 311, Bioteck Instruments).

Les titres ou anticorps correspondent à l'inverse de la dernière dilution de sérum donnant un résultat positif (DO supérieur à 0,1).

Les résultats sont exprimés en moyenne géométrique de titres calculée à partir des différents titres obtenus à partir de chaque souris de chaque groupe.

II - Résultats

a) Désassemblage - réassemblage des VLPs de papillomavirus

Les VLPs d'HPV-16 ont été produites dans des cellules d'insectes Sf21 en utilisant un baculovirus recombinant.

Les VLPs ont été purifiées par ultracentrifugation en sucrose, puis en gradient de CsCl (Le Cann et al., 1994).

Les fractions du gradient de CsCl contenant les VLPs ont été regroupées, diluées dans du PBS puis ultracentrifugées.

Le culot est ensuite resuspendu dans un tampon contenant EGTA et DTT et incubé à température ambiante pendant 30 mn. Dans ces conditions, les VLPs sont complètement désagrégées en structures ressemblant aux capsomères.

L'ADN plasmidique est alors ajouté et la préparation est diluée dans un tampon contenant une forte concentration en calcium et du DMSO 1 % de manière à reformer les VLPs. Environ 75 % des protéines L1 semblent se réassembler en VLPs dans ces conditions.

b) Transfert *in vitro* d'ADN plasmidique par l'intermédiaire des VLPs de papillomavirus

Les cellules HeLa ont été étudiées pour leur sensibilité aux VLPs-pGreenLantern. La fluorescence de la protéine GFP, produite dans les cellules transfectées a été analysée par cytométrie en flux. 70 % des cellules HeLa transfectées par le plasmide pGreenLantern encapsidé dans les VLPs sont fluorescentes (Tableau 1).

En comparaison, aucune cellule fluorescente n'a été trouvée lorsque les cellules sont incubées avec l'ADN plasmidique seul, ou avec le plasmide et la protéine L1 assemblée en capsomères, et 40 % des cellules sont fluorescentes lorsqu'elles sont traitées avec le plasmide pGreenLantern et la lipofectamine®.

La spécificité du transfert par les VLPs a de plus été démontrée par le fait que des anticorps anti-VLPs d'HPV-16 bloquent complètement le transfert de gènes et que le traitement par la Benzonase n'affecte pas le transfert. Les capsomères libres ne peuvent pas agir en tant que vecteurs pour le transfert de gènes. De plus, aucun transfert de gène n'a pu être identifié avec 0,5 µg de VLPs-pGreenLantern lorsque les cellules HeLa ont été incubées avec 10 µg (excès de 20 fois) de VLPs d'HPV-16 vides (Tableau 1).

Tableau 1 :

Transfert du gène de la GFP par les pseudo-particules virales de VPH-16 :
mise en évidence et spécificité

Cellules HeLa traitées avec	% cellules fluorescentes
5 µg de VLP-pGreenLantern	70 %
5 µg de VLP-pGreenLantern + Benzonase®	70 %
5 µg de VLP-pGreenLantern + AC anti-VLPs d'HPV-16	0 %
5 µg de capsomères + pGreenLantern	0 %
pGreenLantern + Lipofectamine®	40 %
pGreenLantern	0 %

Le transfert de l'ADN de pCMV-βgal a également été étudié.

Les résultats montrent que les deux plasmides ont été transfectés avec la même efficacité et la proportion des cellules transfectées est similaire à celle évaluée par cytométrie en flux.

L'expression de la β-galactosidase a été mesurée par ELISA dans le lysat cellulaire. Les résultats indiquent que le niveau d'expression correspond avec la quantité de pCMV-βgal -VLPs utilisée. Une augmentation du niveau d'expression de la β-galactosidase d'environ 100, a été observée entre des concentrations de vecteur VLP de 1 à 10 µg.

Huit lignées cellulaires ont été étudiées pour leur capacité à être transfectées par le plasmide pCMV-βgal encapsidé dans les VLPs d'HPV-16.

Les résultats (Tableau 2) montrent que toutes les lignées cellulaires peuvent être transfectées par ce vecteur et que le niveau d'expression β-gal obtenu est généralement 3 à 6 fois plus élevé que celui observé après transfection des mêmes cellules par lipofection. Toutefois, le niveau d'expression de la β-galactosidase varie de 102 pg/ml dans les cellules Vero à 2253 pg/ml dans les cellules CaCo2.

Tableau 2 :

Efficacité du transfert de gène médié par les pseudo-particules virales dans différentes lignées cellulaires animales et humaines

Lignées cellulaires étudiées	β -galactosidase produite (pg/ml)	
	Lipofectamine	Pseudo-particules
MRC5	79	265
HeLa	234	852
CaCo2	320	2253
NIH3T3	65	275
Cos-7	487	3142
Vero	41	102
MDCK	5	145
CHO	43	150

c) Réponse immune humorale chez les souris immunisées avec l'ADN de pCMV-HBc encapsidé à l'intérieur des VLPs d'HPV-16

L'immunisation par l'ADN a été étudiée chez les souris BALB/c, en utilisant le plasmide pCMV-HBc codant pour l'antigène du noyau de l'hépatite B comme application possible du transfert de gène au moyen d'un gène encapsidé dans les VLPs d'HPV-16.

Les résultats de deux injections intramusculaires de 5 μ g de pCMV-HBc-HPV-VLPs dans un intervalle de deux semaines ont été comparés à ceux obtenus par injection intramusculaire de 100 μ g d'ADN plasmidique seul, et à ceux obtenus par injection intramusculaire de 5 μ g de VLPs d'HBc produites dans les cellules Sf21 avec un baculovirus recombinant.

Les anticorps anti-HBc ont été observés chez tous les animaux immunisés. Toutefois, le titre anti-HBc (20,138) est plus élevé chez les souris immunisées avec pCMV-HBc encapsidé à l'intérieur des VLPs d'HPV, que chez les souris immunisées avec pCMV-HBc seul (1,000 à 1,600), et plus élevé que le titre (6,400) observé par injection intra-musculaire de capsides HBc.

Des anticorps anti-HPV-16 n'ont pas été détectés chez les souris immunisées avec les VLPs d'HBc ou avec l'ADN d'HBc, mais sont présents à un titre

du 800 chez les souris immunisées avec les VLPs d'HPV contenant l'ADN d'HBc après la deuxième injection. Le niveau d'anticorps anti-HPV-16 est toutefois beaucoup plus faible que celui observé chez les souris immunisées avec 5 μ g de VLPs d'HPV absorbées sur Al(OH)₃ en tant qu'adjuvant, chez lesquelles les titres anti-VLP atteignent 30,000 à 70,000.

III- Conclusion

Les VLPs de protéine L1 d'HPV-16, obtenues par expression de la protéine majeure de capside du papillomavirus humain de type 16 dans des cellules d'insectes, peuvent encapsider un plasmide portant soit un gène pour la protéine GFP, soit un gène pour la β -galactosidase lors du désassemblage-réassemblage *in vitro* des VLPs.

L'introduction du plasmide dans différentes cellules par ces pseudovirions ou virus artificiels, est facilement détectée par l'accumulation du produit du gène, et le nombre de cellules porteuses du gène est fonction de la concentration en VLPs d'HPV-16 dans l'expérience de transfert.

La mise en évidence de l'encapsulation du plasmide plutôt qu'une association entre le plasmide et la protéine L1 est basée sur la résistance à la Benzonase[®] du transfert d'ADN médié par les VLPs à l'intérieur des cellules.

L'efficacité du transfert de gène par les VLPs excède considérablement celle obtenue par le phosphate de calcium ou la transfection lipidique.

Par opposition aux résultats obtenus par d'autres équipes (Zhou et al., 1994 ; Roden et al., 1996 ; Unckell et al., 1997), les résultats présentés ici indiquent que la protéine L2 d'HPV n'est pas nécessaire pour une encapsidation efficace de l'ADN, ni pour son transfert dans une cellule hôte. De plus, le transfert du gène est 10^3 à 10^4 fois plus efficace qu'avec les systèmes décrits par ces auteurs.

D'après les résultats obtenus, entre environ 1/3 et 1/6 des VLPs d'HPV-16 contiennent un plasmide, ces proportions étant en corrélation avec le nombre de VLPs trouvé dans la fraction lourde des gradients de CsCl. On peut comparer ces proportions à celles de 1/25 000 VLPs d'HPV-33 exprimées dans les cellules Cos-7 contenant des copies multiples d'un marqueur plasmidique décrites dans l'article d'Unckell et al., susmentionné. Si l'on considère que les VLPs ont 72 capsomères, chaque capsomère étant un pentamère de L1 et que les VLPs représentent 50% du contenu en protéines de la préparation, il a été calculé que 150 VLPs par cellules sont utilisées lors des expériences de transfection. Lors des expériences de transfection des cellules HeLa par pCMV- β gal ci-dessus, on peut estimer que 6000 VLPs par cellules

sont nécessaires pour observer l'expression de β -galactosidase, tandis que l'article Unckell et al fait état de 5×10^7 VLPs par cellule. Si l'on considère que 1 VLP sur 6 contient le plasmide, on peut calculer que 1 sur 1000 VLPs contenant le plasmide est capable de transfecter le plasmide pCMV- β gal dans les cellules HeLa.

Le transfert de gène a été spécifiquement inhibé soit par préincubation des VLPs avec un antisérum anti-VLP, soit par compétition avec des VLPs d'HPV-16 vides. Par conséquent, les pseudovirions d'HPV décrits ici représentent également un système utile pour la détection d'anticorps neutralisant anti-papillomavirus.

L'utilisation des VLPs pour le transfert de gènes présente des avantages par rapport à l'utilisation des virus recombinants. La production de tels pseudovirions est beaucoup plus facile que celle des vecteurs viraux usuels, et le risque d'induction d'anticorps neutralisant est plus faible. De plus, ces pseudovirions sont plus sûrs d'utilisation car aucune recombinaison avec un virus sauvage n'est possible, puisqu'ils ne contiennent pas de séquence d'ADN de papillomavirus.

REFERENCES

Banerjee, S. et al., 1995 - Nature Med. 1 : 1303-1308

Berkner, K.L., 1992 - Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158 : 39-66

Colomar, M.C. et al., 1993 - J. Virol. 67 : 2779-2786

Danos, O. & Mulligan R.C., 1988 - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 6460-6464

Felgner, P.L. et al., 1987 - Proc. Natl. Acad. Sci USA 84 : 7413-7417

Felgner, P.L. & Ringold G. M., 1989 - Nature 337 : 387-388

Fisher, K.J. et al., 1997 - Nature Med. 3 : 306-312

Gahéry-Ségard, H. et al., 1997 - Eur. J. Immunol. 27 : 653-659

Juillard, V. et al., 1995 - Eur. J. Immunol. 25 : 3467-3473

Kamata, H. et al., 1994 - Nucleic Acids Res. 22 : 536-537

Kotin, R.M., 1994 - Hum. Gene Ther. 5 : 793-801

Kozarsky, K.F. & Wilson, J.M., 1993 - Curr. Opin. Genet. Dev. 3 : 499-503

Kremer, E.J. & Perricaudet, M., 1995 - Br. Med. Bull. 51 : 31-44

Le Cann, P. et al., 1994 - FEMS Microbiol. Letters 117 : 269-274

Li, M. et al., 1997 - J. Virol. 71 : 2988-2995

Miller, A.D., 1992 - Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158 : 1-24

Naldini, L. et al., 1996 - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 11382-11388

Roden, R.B.S. et al., 1996 - J. Virol. 70 : 5875-5883

Unckell, F. et al., 1997 - J. Virol. 71 : 2934-2939

Wagner, E. et al., 1994 - Advance Drug Delivery Reviews 14 : 113-135

Zhou, J. et al., 1994 - J. Virol. 68 : 619-625

REVENDICATIONS

1. Utilisation de pseudo-particules virales (VLPs) de papillomavirus humains ou animaux, pour la préparation de pseudovirus vecteurs utilisables pour le transfert de matériel génétique d'intérêt thérapeutique dans des cellules cibles de l'organisme, en particulier dans le cadre d'une thérapie génique, ou d'une immunisation génique.

2. Utilisation selon la revendication 1, de VLPs contenant la protéine L1, et le cas échéant la protéine L2, des papillomavirus.

3. Utilisation de VLPs de papillomavirus définies dans les revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament comprenant des pseudovirus vecteurs correspondant auxdites VLPs dans lesquelles une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont encapsidées, lesdits pseudovirus étant en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, ledit médicament étant destiné au traitement ou à la prévention de pathologies, telles que décrites ci-dessus, susceptibles d'être traitées par thérapie génique ou d'être prévenues par immunisation génique.

4. Pseudovirus vecteur de transfert de matériel génétique dans des cellules cibles de l'organisme dans le cadre de la thérapie génique, ou de l'immunisation génique, caractérisé en ce qu'il correspond à une VLP de papillomavirus humains ou animaux, dans laquelle une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique sont encapsidées.

5. Pseudovirus vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que les VLPs contiennent la protéine L1 et, le cas échéant, la protéine L2, des papillomavirus.

6. Pseudovirus vecteur selon la revendication 4 ou 5, tel qu'obtenu par un procédé extracellulaire d'encapsidation d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues d'intérêt thérapeutique à l'intérieur des VLPs, notamment par un procédé de désassemblage-réassemblage *in vitro* des VLPs, en présence d'un plasmide contenant la (ou les) séquence(s) d'ADN hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique.

7. Pseudovirus vecteur selon la revendication 6, tel qu'obtenu par un procédé de désassemblage-réassemblage, *in vitro*, des VLPs comprenant les étapes suivantes :

- désassemblage des VLPs en capsomères, notamment par incubation de ces dernières avec un agent chélateur tel que l'éthylène glycol tétracétate (EGTA), ou l'éthylène diamine tétracétate (EDTA), et d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT), ou le β -mercaptoéthanol,
- mise en mélange du plasmide contenant la (ou les) séquence(s) d'ADN hétérologue(s) d'intérêt thérapeutique, avantageusement dans un rapport d'une molécule de plasmide pour une molécule de VLP (soit environ $1\mu\text{g}$ de plasmide, pour environ $5\mu\text{g}$ de VLP),
- réassemblage des capsomères en VLPs contenant le plasmide susmentionné, notamment par augmentation de la concentration en ions Ca^{++} , et addition d'un agent oxydant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par toute autre méthode neutralisant l'action de l'agent réducteur susmentionné,

8. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un pseudovirus vecteur selon l'une des revendications 4 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

9. Utilisation de pseudovirus vecteurs correspondant aux VLPs contenant la protéine L1 et, le cas échéant, de la protéine L2, des papillomavirus humains ou animaux, dans lesquelles une ou plusieurs séquences nucléotidiques hétérologues (notamment des séquences nucléotidiques codant pour des gènes rapporteurs) sont encapsidées, lesdits pseudovirus vecteurs étant obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsulation desdites séquences nucléotidiques hétérologues dans lesdites VLPs, pour la mise en oeuvre d'un procédé de transfert *in vitro* desdites séquences nucléotidiques hétérologues dans des cellules susceptibles d'être infectées par lesdits pseudovirus vecteurs.

10. Utilisation de pseudovirus vecteurs correspondant aux VLPs contenant la protéine L1 et, le cas échéant, de la protéine L2, des papillomavirus humains ou animaux, dans lesquelles au moins un gène rapporteur est encapsidé, lesdits pseudovirus étant tels qu'obtenus par un procédé extracellulaire d'encapsulation du (ou des) gène(s) rapporteur(s) dans lesdites VLPs, pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection d'anticorps neutralisant l'infection des papillomavirus humains ou animaux.

11. Procédé de préparation de pseudovirus de papillomavirus humains et animaux, lesdits pseudovirus étant susceptibles d'être utilisés en tant que vecteur de transfert de matériel génétique dans des cellules cibles, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- désassemblage des VLPs en capsomères, notamment par incubation de ces dernières avec un agent chélateur tel que l'éthylène glycol tétracétate (EGTA), ou l'éthylène diamine tétracétate (EDTA), et d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT), ou le β -mercaptoéthanol,

- mise en mélange du plasmide contenant la (ou les) séquence(s) d'ADN hétérologue(s), le cas échéant d'intérêt thérapeutique, avantageusement dans un rapport d'une molécule de plasmide pour une molécule de VLP (soit environ $1\mu\text{g}$ de plasmide, pour environ $5\mu\text{g}$ de VLP),

- réassemblage des capsomères en VLPs contenant le plasmide susmentionné, notamment par augmentation de la concentration en ions Ca^{++} , et addition d'un agent oxydant tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par toute autre méthode neutralisant l'action de l'agent réducteur susmentionné, notamment par dialyse.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 98/02029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N7/04 C12N15/88 A61K48/00 A61K39/12 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UNCKELL F. ET AL.: "Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 4, April 1997, pages 2934-2939, XP002076557 cited in the application	1-5,8
Y	see the whole document ---	6-9,11
Y	WO 97 17456 A (YISSUM RES DEV CO ;HADASIT MED RES SERVICE (IL); SANDALON ZIV (IL)) 15 May 1997 see the whole document, in particular page 27, lines 4-21 -/--	6-9,11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
* Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10 February 1999</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">17/02/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Mandl, B</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02029

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROSE R. C. ET AL.: "Expression of human Papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: In vivo and in vitro assembly of viruslike particles." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, 1993, pages 1936-1944, XP002076558 see the whole document	1-11
A	COLOMAR M. C. ET AL.: "OPENING AND REFOLDING OF SIMIAN VIRUS 40 AND IN VITRO PACKAGING OF FOREIGN DNA" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 5, May 1993, pages 2779-2786, XP000645492 cited in the application see the whole document	1-11
A	FORSTOVA J. ET AL.: "POLYOMA VIRUS PSEUDOCAPSIDS AS EFFICIENT CARRIERS OF HETEROLOGOUS DNA INTO MAMMALIAN CELLS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 3, March 1995, pages 297-306, XP000645479 see the whole document	1-11
A	MÜLLER M. ET AL.: "Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 2, February 1995, pages 948-954, XP002076556 see the whole document	1-11
A	WO 92 16638 A (PRIME 3 PRIME INC 5) 1 October 1992 see the whole document	1-11
P,X	TOUZE A. ET AL.: "In vitro gene transfer using human papillomavirus -like particles." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 5, 1 March 1998, pages 1317-1323, XP002076559 see the whole document	1-11
P,X	WO 97 46693 A (BLOCH MARIE ALINE ; PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC (FR)) 11 December 1997 see the whole document	1-9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02029

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9717456	A	15-05-1997	AU 7331496	A	29-05-1997
			EP 0859855	A	26-08-1998
WO 9216638	A	01-10-1992	NONE		
WO 9746693	A	11-12-1997	FR 2749323	A	05-12-1997
			AU 3098097	A	05-01-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 98/02029

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N7/04 C12N15/88

A61K48/00

A61K39/12

G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	UNCKELL F. ET AL.: "Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 4, avril 1997, pages 2934-2939, XP002076557 cité dans la demande	1-5,8
Y	voir le document en entier	6-9,11
Y	WO 97 17456 A (YISSUM RES DEV CO ;HADASIT MED RES SERVICE (IL); SANDALON ZIV (IL)) 15 mai 1997 * le document en entier, en particulier page 27, lignes 4-21	6-9,11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mandl, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De .de Internationale No
PCT/FR 98/02029

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ROSE R. C. ET AL.: "Expression of human Papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: In vivo and in vitro assembly of viruslike particles." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, 1993, pages 1936-1944, XP002076558 voir le document en entier ----	1-11
A	COLOMAR M. C. ET AL.: "OPENING AND REFOLDING OF SIMIAN VIRUS 40 AND IN VITRO PACKAGING OF FOREIGN DNA" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 5, mai 1993, pages 2779-2786, XP000645492 cité dans la demande voir le document en entier ----	1-11
A	FORSTOVA J. ET AL.: "POLYOMA VIRUS PSEUDOCAPSIDS AS EFFICIENT CARRIERS OF HETEROLOGOUS DNA INTO MAMMALIAN CELLS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 3, mars 1995, pages 297-306, XP000645479 voir le document en entier ----	1-11
A	MÜLLER M. ET AL.: "Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 2, février 1995, pages 948-954, XP002076556 voir le document en entier ----	1-11
A	WO 92 16638 A (PRIME 3 PRIME INC 5) 1 octobre 1992 voir le document en entier ----	1-11
P,X	TOUZE A. ET AL.: "In vitro gene transfer using human papillomavirus -like particles." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 5, 1 mars 1998, pages 1317-1323, XP002076559 voir le document en entier ----	1-11
P,X	WO 97 46693 A (BLOCH MARIE ALINE ; PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC (FR)) 11 décembre 1997 voir le document en entier -----	1-9,11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De .de Internationale No

PCT/FR 98/02029

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9717456 A	15-05-1997	AU 7331496 A EP 0859855 A	29-05-1997 26-08-1998
WO 9216638 A	01-10-1992	AUCUN	
WO 9746693 A	11-12-1997	FR 2749323 A AU 3098097 A	05-12-1997 05-01-1998

